

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-099962

(43)Date of publication of application : 18.04.1995

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

(21)Application number : 05-250250

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 06.10.1993

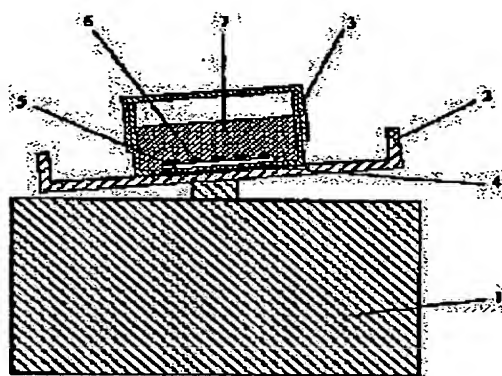
(72)Inventor : MIYAMOTO SHIGEYUKI

(54) APPARATUS FOR ARRANGING AND CULTURING CELL AND METHOD THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for enabling to obtain a cell sequence having high resolution on a substrate by further suppressing adhesion of a cell to the substrate surface processed so as not to bond the cell thereto.

CONSTITUTION: A culture vessel 3 in which a substrate 5 having patterns mutually different in cell adhesive property on its surface, a cell 6 and a liquid medium 7 are housed is fixed on a vibrating table 2 of a stirrer 1. Rotation or vibration is given to the culture vessel 3 by the stirrer 1 and culture of the cell 6 is carried out while stirring the liquid medium 7.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.03.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2500472

[Date of registration] 13.03.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-99962

(43)公開日 平成7年(1995)4月18日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

C 1 2 M 3/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平5-250250

(22)出願日 平成5年(1993)10月6日

(71)出願人 000004237

日本電気株式会社

東京都港区芝五丁目7番1号

(72)発明者 宮本 重幸

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内

(74)代理人 弁理士 京本 直樹 (外2名)

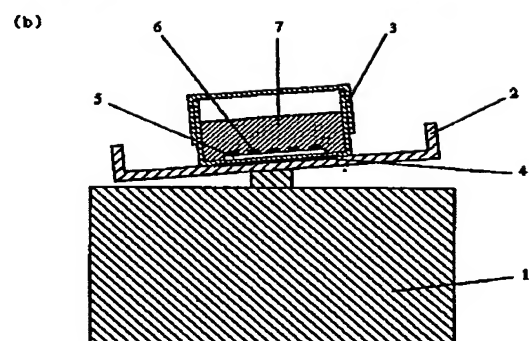
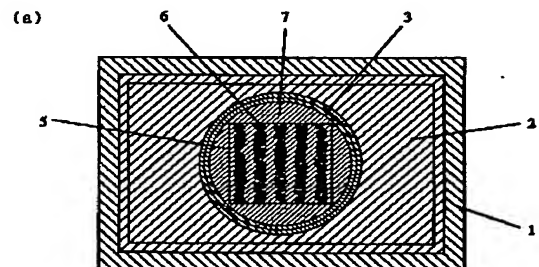
(54)【発明の名称】 細胞配列培養装置およびその方法

(57)【要約】

【目的】 解像度の高い細胞配列を実現する。

【構成】 細胞接着性の異なるパターンを表面に有する基板5と細胞6と液体培地7が収容された培養容器3が、攪拌器1の振とう台2の上に固定されている。攪拌器1によって培養容器3に回転あるいは振動を与え、液体培地7を攪拌しながら細胞6の培養を行なう。

【効果】 攪拌することにより、基板5上の細胞が接着しにくく加工した表面への細胞の接着をさらに抑制するので、基板5上に解像度の高い細胞配列を得ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 接着性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板と、前記基板と細胞と前記細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、前記培養容器に回転あるいは振動を加える攪拌器とから構成される細胞配列培養装置。

【請求項2】 接着性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板と、前記基板と細胞と前記細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、前記培養容器内の液体培地を循環させるポンプとから構成される細胞配列培養装置。

【請求項3】 接着性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板を用いて細胞を培養する細胞配列培養方法であって、細胞を培養する全部あるいは一部の期間に液体培地を攪拌あるいは循環させることを特徴とする細胞配列培養方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞を配列して形成させるための細胞配列培養装置およびその方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産等の目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。

【0003】一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスチック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。

【0004】一方、培養細胞を基板上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような複数の表面がパターンを成しているような基板を用い、この上で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。

【0005】例えば、特開平2-245181号公報には、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特開平3-7576号公報では、細胞

非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィー法によりパターンニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。また、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射して細胞接着性の官能基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって重合開始種を誘導し、この上に細胞接着性あるいは細胞非接着性モノマーを重合させるなどして表面をパターンニングし、これによって細胞の配列を制御した特開平3-7577号公報の例がある。

【0006】さらに、特開平3-357910号明細書では、細胞の接着率や形態に影響をあたえるコラーゲンなどの物質がパターンニングされた細胞培養用基板と、この基板をフォトリソグラフィー法によって作製する方法について開示している。このような基板の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターンニングされた表面に多くに細胞を接着させ、細胞のパターンニングを実現している。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】従来の培養細胞を配列させる方法は、通常の細胞培養方法と同様に、細胞培養の際に細胞や培地を収納した培養容器を静置して培養をおこなっている。しかし、培養容器を静置した状態で培養を行った場合、細胞が接着しないように加工した表面であってもそこに細胞がとどまると、細胞は細胞外マトリクスを分泌し、その位置で接着する。その結果、細胞の接着を望まない表面にも細胞の接着が生じ、細胞配列の解像度が低下するという問題点がある。

【0008】本発明の目的は、上記従来技術の問題点をなくし、解像度の高い細胞配列を実現する細胞配列培養装置およびその方法を提供することにある。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明による細胞配列培養装置は、接着性細胞に対して接着の容易さが異なるような複雑の表面がパターンを成している基板と、この基板と細胞とこの細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、この培養容器に回転あるいは振動を加える攪拌器とから構成される。

【0010】あるいは、接着性細胞に対して接着の容易さが異なるような複雑の表面がパターンを成している基板と、この基板と細胞とこの細胞の生育のための液体培地を収納した培養容器と、この培養容器内の液体培地を循環させるポンプとから構成される細胞配列培養装置である。

【0011】また、本発明による細胞配列培養方法は、接着性細胞に対して接着の容易さが異なる複数の表面がパターンを成している基板を用いて細胞を培養し、細胞を培養する全期間あるいは一部の期間に液体培地を攪拌あるいは循環することを特徴とする。

## 【0012】

【作用】本発明においては、接着性細胞に対して接着の容易さが異なる複数の表面がパターンを成している基板を用いて、細胞の配列を形成するために、培養を行っている間ずっと、あるいは培養中のある時間培地を攪拌するので、基板上の細胞が接着しづらく加工した表面に細胞が接着しようとしても、培地の流れによってこの表面部分への細胞の接着を防ぐことができる。一方、攪拌の強さが強すぎなければ、培地の流れは基板上の細胞が接着しやすく加工した表面への細胞の接着にはほとんど影響を及ぼさない。その結果、細胞が接着しやすく加工した、細胞の接着を望む部分への細胞の接着は実現しながら、細胞が接着しづらく加工した、細胞の接着を望まない表面への細胞の接着を制御することができ、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

#### 【0013】

【実施例】次に本発明の実施例について図面を参照して説明する。

【0014】（実施例1）図1は、第一の発明の細胞配列培養装置の一実施例を示した図で、図1（a）は、装置の横断面図、図1（b）は装置の縦断面図である。本装置は、攪拌器1の振とう台2の上に培養容器3が粘着テープ4によって固定されている。この培養容器3の中には、基板5上で細胞が配列するようにその表面が接着細胞配列に対しての接着の容易さが異なるパターンを有するように加工された基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。攪拌器1は、振とう台2を水平から10度まで傾けた状態で保持し、振とう台2を毎分20回転から120回転の速度で回転させることができる。培養容器3には直径41mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用した。攪拌器1を駆動すると、振とう台2は傾いた状態で回転するので、液体培地7に対して攪拌が加えられる。この攪拌によって、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0015】本装置を用いれば、振とう台2の傾きや回転速度を調節することによって、細胞配列の形成に最適な攪拌の強さにすることを容易に行なうことができる。

【0016】粘着テープ4の接着強度は、攪拌によって培養容器3が振とう台2の上を移動したり、振とう台2から離れたりしなければよい。また、培養操作での利便を考慮して、培養容器3は振とう台2から容易に取り外せることが望ましい。このような条件を満たせば、振とう台2への培養容器3の固定手段は粘着テープに限らない。例えば、粘着テープ4の代わりに、ばねによって培養容器3を挟んで固定できるような治具を振とう台2に設けることもできる。

【0017】（実施例2）図2は、第一の発明の細胞配列培養装置の別の実施例を示した図であり、図2

（a）はこの装置の横断面図、図2（b）は装置の縦断面図である。本装置は、台8の上にスペーサ9を介して振動体10が固定されている。振動体10には3本の腕

11が設けられており、培養容器3はこの腕11によって振動体10の上に保持されている。培養容器3の中には、細胞が配列するように表面を加工した基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。振動体10は、株式会社シコー技研のマイクロ振動モータSE-7ALを、培養容器3には直径41mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用した。振動体10を駆動することによって生じた振動は、腕11を通じて培養容器3に伝えられ、培養容器3の中の液体培地7に対して攪拌が加えられる。これによって、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0018】本装置は、振動体10に印加する電圧を変えたり、腕11と培養容器3の間にあそびを設けることによって攪拌の強さを制御することができる。本装置は実施例1の装置に比べて厳密な攪拌の制御は難しいものの、装置の小型化が容易な長所がある。

【0019】培養容器3の中の液体培地7を十分に攪拌できる強さの振動を生じるものであれば、振動体10は振動モータに限らず、例えば、圧電アクチュエータなどを用いることもできる。

【0020】攪拌によって培養容器3が振動体10を移動したり、振動体10から離れたりしなければ、振動体10への培養容器3の固定手段は腕11に限らないが、培養操作での利便を考慮して、培養容器3は振動体10から容易に取り外せることが望ましい。

【0021】振動体10の振動が台8に伝わると、装置全体が振動し、装置を安定に設置することができなくなる。そのため、振動体10の振動が台8に伝わらないように、スペーサ9の材質はゴムなど振動を吸収する材質が適している。

【0022】（実施例3）図3は、第二の発明の細胞配列培養装置の一実施例を示し、図3（a）はこの装置の横断面図、図3（b）は装置の縦断面図である。培養容器3の上部には、導出口12と導入口13が設けられており、導出口12は導出管14、導入口は導入管15を介してポンプ16と接続されている。培養容器3の中には、実施例1、2で用いた基板と同様な細胞接着性の異なるパターンを表面に有する基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。ポンプ16には、東京理化学株式会社のマイクロチューブポンプMP-3を、培養容器3には直径41mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用した。ポンプ16により、培養容器3の中の液体培地7は導出口12から導出管14、導入管15を通じて、導入口13から再び培養容器3に導入される。このように液体培地7が流れた状態で培養を行なうことができるので、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0023】本装置は、ポンプ16の吐出流量を変化させることによって、培地の流速を非常に厳密に制御することができるので、実施例1の装置よりさらに解像度の高い細胞配列を得ることが可能である。

【0024】本装置の導出口12の取り付け位置は、培養容器3内の液体培地7を取り出すことができる位置であれば、本実施例のような液体培地7の液面だけでなく培養容器3側面などの位置に設けても良い。ただし、導出口12を培養容器3に収納されている基板5に近い位置に設けることは適当でない。本実施例の場合、基板5は培養容器3の底面にあるので、導出口12を培養容器3の底面に近い位置に設けることは適当でない。それは、液体培地7の流れは導出口12付近で局所的に速くなるので、導出口12が基板5の近くにあると、導出口12に近い基板5の表面部分への細胞6の接着が阻害されるからである。そのため、導出口12は培養容器3に収容されている基板5から遠い位置、つまり液体培地7の液面に近い位置に設けるのが望ましい。

【0025】本装置の導入口13の取り付け位置は、培養容器3内の上部だけでなく側面などの位置に設けても良い。ただし、導入口13を培養容器3内の液体培地7の液面よりはなれた高い位置に設けると、導入口13からの液体培地7の流れ込みの衝撃により、液体培地7に乱流が生じるので適当でない。また、導入口13を培養容器3に収容されている基板5に近い位置、つまり導入口13を培養容器3の底面に近い位置に設けることも適当でない。それは、液体培地7の流れは導入口13付近で局所的に速くなるので、基板5が導入口13の近くにあると、基板5の表面の導入口13に近い部分への細胞6の接着が阻害されるからである。そのため、導入口13は培養容器3に収容されている基板5から遠い位置でかつ液体培地7の液面からあまり高くない位置、つまり液体培地7の液面に近い位置に設けるのが望ましい。

【0026】本装置の導出管14あるいは導入管15の間に、外部から新たな液体培地7を添加させる経路と、使用済みの液体培地7を外部に排出する経路を設けてもよい。この場合、培養の際の培地交換の手間が省けるため好適である。

【0027】(実施例4)次に、第三の発明の細胞配列培養方法の例について説明する。装置は実施例1と同じ装置を用いた。基板は厚さ0.5mmの石英板であり、基板の表面に部分的に細胞接着性物質であるコラーゲンが吸着し、その他の部分は細胞接着性を示さない石英が露出している。一つのコラーゲン吸着面は直径100μmの円形であり、多数のコラーゲンの円が間隔100μmで配列している。細胞は、大日本製薬株式会社から購入したヒト由来の臍帯血管内皮細胞HUV-EC-4を、液体培地は10%の牛胎児血清と10ng/mlの繊維芽細胞成長因子を加えた、クロレラ工業株式会社のヒト毛細血管内皮細胞用培地CHL-MCDB131を

使用した。

【0028】攪拌器の振とう台の傾きを5度、回転速度を毎分30回転に設定し、この振とう台の中央に、底部に上記の基板を置き細胞と液体培地とを収納した培養容器を粘着テープによって固定した。この細胞配列培養装置を37℃、5%二酸化炭素、飽和水蒸気の条件に設定したインキュベーターの庫内に設置し、培養開始5分後から10分おきに振とう台の回転、停止を繰り返しながら24時間培養を行った。その結果、基板表面の石英が露出した部分に比べ、コラーゲンが吸着した円形の部分により多くの血管内皮細胞が接着し、細胞配列が形成された。

【0029】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の細胞配列培養装置およびその方法は、液体培地を攪拌しながら細胞を培養するので、細胞接着の容易性の異なるパターンを有する基板上において細胞が接着しにくい表面への細胞の接着を抑制し、細胞が接着しやすく加工した表面に多くの細胞を接着させることができ、その結果解像度の高い細胞配列を得ることができる。本発明を利用することにより、培養細胞の人工臓器やバイオセンサへの応用が容易になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の細胞配列培養装置の一実施例を示した図である。

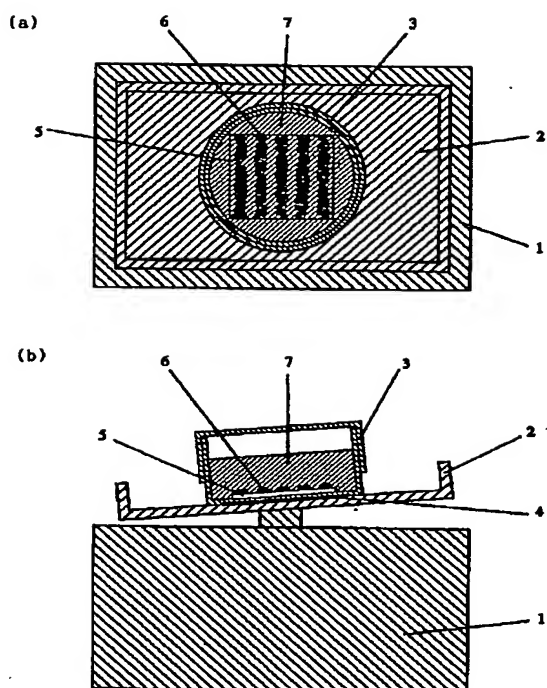
【図2】本発明の細胞配列培養装置の別の一実施例を示した図である。

【図3】本発明の細胞配列培養装置のさらに別の一実施例を示した図である。

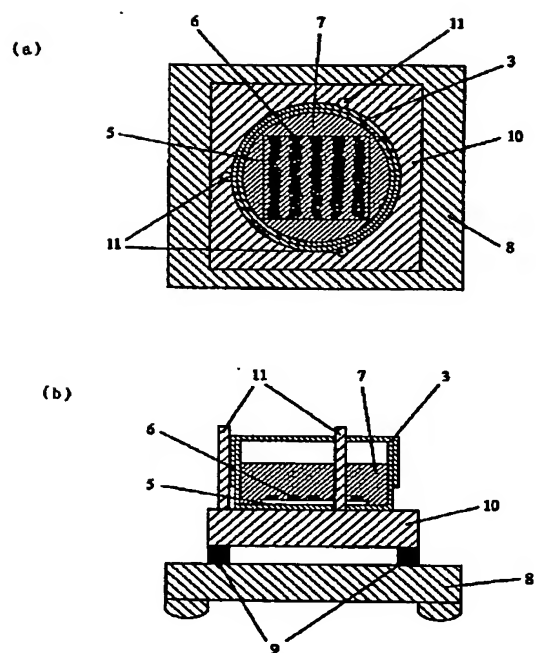
【符号の説明】

- 1 攪拌器
- 2 振とう台
- 3 培養容器
- 4 粘着テープ
- 5 基板
- 6 細胞
- 7 液体培地
- 8 台
- 9 スペーサ
- 10 振動体
- 11 腕
- 12 導出口
- 13 導入口
- 14 導出管
- 15 導入管
- 16 ポンプ

【図1】



【図2】



【図3】

